



Studies on the Cell-Cycle Entry Mechanism of Retinal Pigment Epithelium Cells of the Adult Newt, *Cynops pyrrhogaster*

著者	吉川 太朗
その他のタイトル	成体イモリの網膜色素上皮細胞周期進入メカニズムに関する研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102甲第6750号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00122230

氏名（本籍）	吉川 太朗 （ 岡山県 ）		
学位の種類	博 士 （ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6750 号		
学位授与年月日	平成26年 2月28日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Cell-Cycle Entry Mechanism of Retinal Pigment Epithelium Cells of the Adult Newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> (成体イモリの網膜色素上皮細胞の細胞周期進入メカニズムに関する研究)		
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	千葉 親文
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	栗崎 晃
副査	筑波大学准教授	医学博士	中谷 敬

論 文 の 要 旨

視覚は動物の生命活動にとって重要な感覚である。脊椎動物においては、眼球内にある網膜が視覚の初期過程を担っている。網膜色素上皮（RPE）は、網膜の最外層にあり、神経性網膜の代謝や生理機能にとって欠かせない役割を果たしている。ところが事故などにより網膜が外傷を被ると、この細胞は上皮の性質を失い分裂・増殖を開始する。ヒトでは、RPE 細胞の増殖は失明につながる疾患の原因である。一方、両生類のイモリでは、RPE 細胞が増殖し完全な網膜を再生する。このことから、イモリの網膜再生は、網膜外傷性疾患の治療と網膜再生の誘導のための基礎的知見を得る良いモデルである。これまでに RPE 細胞の増殖制御に関する研究は数多くなされてきた。しかし、RPE 細胞が、網膜の外傷後、最初に細胞周期に進入するメカニズムについては、良い実験系がないためほとんど研究されてこなかった。そこで本研究では、イモリにおいて新たな実験系を開発し、この問題にアプローチした。

まず、*in vitro* で網膜除去手術を施し、RPE を眼球の後極側半分の組織（Retina-less eye-cup: RLEC）ごと培養する実験系（RLEC 培養系）を構築した。この条件下で、RPE 細胞は *in vivo* と同様の時間経過で細胞周期に進入した。また、明らかな細胞死や変性もみられなかったことから、この実験系が本研究目的のために利用可能であると判断した。しかし、*in vivo* と異なり、細胞周期に進入する細胞の割合は、RPE 組織（円盤状のシート）の辺縁部で高く、中央部では低かった。RLEC を半分に切り分けて培養すると、新たにできた切断端（wound edge）付近にも細胞周期に進入する RPE 細胞が多数観察されたことから、組織の切断端付近には RPE 細胞を細胞周期に導引する何らかの因子が存在し、中央部ではこれが欠失しているか、あるいは抑制するメカニズムが存在すると予想された。

続いて、この実験系を利用して RPE 細胞を細胞周期に導引する因子を探索した。まず、培地中に含まれていたヘパリンに促進的な効果があることを明らかにした。ヘパリンは様々な液性因子の安定性や活性に関わることから、RLEC の切断端から漏出する液性因子が疑われた。そこで、ヘパリン結合性であり、しかもイモリにおいて組織再生との関連性が議論されている液性因子（FGF2、Wnt、shh、

thrombin) に着目した。解析の結果、セリンプロテアーゼの一種である thrombin が有力候補としてあがってきた。すなわち、thrombin の活性を阻害する PPACK 存在下で RLEC を作製・培養すると、切断端付近の細胞周期進入率が有意に減少した。一方、thrombin 存在下では有意な変化は観察されなかった。組織中央部での効果を調べると、PPACK による影響はなかったが、thrombin で有意な抑制効果が観察された。血清を含む培地中で thrombin の効果を調べたこと、組織中央部での抑制効果は観察されなくなった。これらの結果は、thrombin が RPE 細胞の細胞周期進入に対して導引と抑制の相反する効果をもつことを示している。また、thrombin の導引効果は間接的で、血清中の因子との相互作用を必要とすると考えられる。

次に、RPE 細胞の細胞周期進入を抑制する因子を探索した。まず、RPE 組織の中央部から、組織の一部を慎重に取り除いた後、RLEC を培養したところ、その周囲の細胞周期進入率が有意に増加することが分かった。このことから細胞間接着の関与が疑われた。そこで、RLEC をあらかじめ細胞間接着を緩める効果のある EGTA で処理して培養したところ、予想通り、RPE 細胞の細胞周期進入率が有意に増加した。これらの結果から、細胞間接着を介したシグナルにより細胞周期進入が抑制されている可能性が考えられる。

RPE 細胞の分裂・増殖は、ヒトにおいては失明の原因となるため治療のターゲットである。一方、イモリにおいては、網膜の再生に欠かせない重要なイベントである。このように、治療と再生の双方の研究において RPE 細胞の分裂・増殖のメカニズムを知ることは重要である。本研究で確立した RLEC 培養系は、RPE 細胞の細胞周期進入メカニズムを調べるための良い実験系を提供すると考えられる。また、本研究で示唆した RPE 細胞の細胞周期進入に関わる因子は、外傷性網膜疾患の治療と網膜再生の分野にとって新しい知見である。イモリにおいては網膜再生の誘導に関わる可能性があるため、今後より深い解析につなげなければならない。一方、ヒトを含む哺乳類においては、対応する知見がないため、同様の実験系を構築して解析する必要がある。網膜を再生しないヒトの RPE 細胞の細胞周期進入メカニズムが、網膜を再生するイモリと共通か否かを調べることは大変興味深い。

審 査 の 要 旨

本論文は、イモリの RPE 細胞が、網膜の外傷後、最初に細胞周期に進入するメカニズムについて研究したものである。前半では、細胞の網膜外傷後の応答性や行動を解析するための新たな実験系を確立した。後半では、この実験系の特徴を活かし、RPE 細胞の細胞周期進入に対して、導引と抑制の相反するメカニズムが存在することを示した。本研究で確立した実験系や得られた知見は、いずれも重要な前進であり、今後の研究に大いに貢献するものである。特に、実験系については、生体内の環境に近づける工夫をすることで、網膜再生の様々な段階の研究にも応用可能である。また、thrombin と血清が導引に関わることや、細胞間接着が抑制に関わることを示した点は、今後のメカニズム解明に大きな手掛かりを与える重要な発見である。したがって本研究が再生生理学の分野に与える影響は大きく、本論文の重要性は高いと言える。

平成 26 年 1 月 8 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。